

Aplicações de Técnicas de Processamento e Análise de Imagem em Processos Biotecnológicos

António Luís Amaral^{1,2}, Madalena Alves¹, Manuel Mota¹ e Eugénio Campos Ferreira¹

¹Centro de Engenharia Biológica, Universidade do Minho
4710-057 Braga, Portugal. E-mails: ecferreira@deb.uminho.pt ; lpamaral@deb.uminho.pt

²Departamento de Tecnologia Química, ESTIG, IPB
Apartado 1038, 5301-854 Bragança, Portugal. E-mail: lpamaral@ipb.pt

RESUMO

Neste trabalho, são apresentados quatro estudos utilizando técnicas de processamento e análise de imagem e de estatística multivariável para monitorizar processos aeróbios e anaeróbios de tratamento de águas residuais. Num primeiro caso visando a caracterização de lamas activadas de uma estação de tratamento de águas residuais (ETAR) foram examinados o conteúdo e morfologia de agregados e bactérias filamentosas. O segundo teve por objectivo a identificação dos protozoários e metazoários através da sua caracterização morfológica e tratamento dos dados por técnicas de estatística multivariável. Relativamente aos processos anaeróbios foi, num primeiro estudo, monitorizado o processo de granulação de um reactor granulado de leito expandido (EGSB), através do estudo das mudanças morfológicas dos agregados microbianos. Finalmente, foi também estudado um processo de desgranulação dos agregados microbianos anaeróbios devido a alimentação com oleato, novamente pela determinação das mudanças morfológicas dos agregados microbianos.

INTRODUÇÃO

As metodologias de processamento e análise de imagem têm-se evidenciado como ferramentas extremamente úteis num vasto leque de aplicações. Uma das maiores vantagens da análise de imagem reside na capacidade de eliminar a subjectividade da análise humana e na possibilidade de extrair dados quantitativos que seria ou muito difícil ou até mesmo impossível de se obter de outra forma. Acresce a este facto também, a possibilidade de se evitarem tarefas extremamente tediosas ou demoradas para os investigadores. Deste modo, tem-se verificado nos últimos anos um elevado acréscimo na aplicação de técnicas de análise de imagem em processos de tratamento aeróbio e anaeróbio de águas residuais principalmente em termos da determinação do conteúdo em bactérias filamentosas e da caracterização morfológica de agregados microbianos (flocos para ambos os casos, *pellets* e grânulos nos tratamentos anaeróbios). Nos processos aeróbios é reconhecida ainda a extrema importância que os protozoários e metazoários apresentam no bom funcionamento dos tanques de arejamento assim como a sua dependência das condições de operação de uma dada ETAR. Não é de estranhar, portanto, que estudos recentes se debrucem sobre a possibilidade da identificação automática destes microrganismos por técnicas de análise de imagem.

Idealmente um agregado microbiano aeróbio deve ser composto por um balanço adequado em termos de bactérias filamentosas e formadoras de flocos (zoogleais). Devem também possuir um tamanho adequado com uma robustez e capacidade de sedimentação elevadas, de modo a se poder obter um efluente final tratado com uma turbidez e conteúdo em matéria orgânica baixos. Os métodos clássicos de determinação e caracterização do conteúdo em bactérias filamentosas e zoogleais consistiam em contagens manuais ao microscópio com uma objectiva micrométrica (Sezgin *et al.*, 1978). Contudo, estas técnicas manuais revelavam-se desgastantes, imprecisas e requeriam um elevado tempo, o que não permita o seu uso

quotidiano em laboratórios de ETARs. Este facto levou à implementação de metodologias de análise de imagem na caracterização da morfologia dos agregados, quer de natureza euclidiana, quer pela adopção de determinações fractais e posterior correlação com parâmetros descritores da capacidade de sedimentação (Grijnspeerdt e Verstraete, 1997). Os resultados obtidos provaram ser a análise de imagem uma ferramenta muito útil para a caracterização quantitativa, quer de agregados quer de bactérias filamentosas dispersas, fornecendo informação valiosa no acompanhamento diário de uma estação. Assim, foi proposta uma metodologia de análise de imagem e subsequentemente testada na monitorização de fenómenos de “*bulking*” em estações piloto por da Motta *et al.* (2003) e municipais por Amaral *et al.* (2002).

Existem na literatura numerosos estudos sobre a colonização de tanques de arejamento de ETARs por protozoários e metazoários que revelam a sua importância no seu bom funcionamento. Sabe-se que possuem um papel primordial na eliminação de bactérias coliformes e patogénicas através da predação, originando deste modo um efluente final clarificado não sendo de menosprezar também para esse efeito a secreção de muco e quebra de flocos excessivamente grandes (Richard, 1989). Consoante as condições de operação de uma ETAR a população de protozoários e metazoários será diferente: Enquanto que durante o arranque de uma ETAR (baixo tempo de residência hidráulico e idade de lamas e alta concentração de nutrientes) predominam os flagelados, sarcodinas e pequenos ciliados nadadores, em estações funcionando em regime estacionário predominam ciliados sésseis, móveis de fundo e mesmo metazoários (Richard, 1989). Deste modo, as condições de operação de uma ETAR mais susceptíveis de poderem ser aferidas pela monitorização dos protozoários e metazoários são a carga orgânica, arejamento, idade das lamas, nitrificação e qualidade do efluente final. Estudos iniciais de monitorização de protozoários e metazoários foram descritos por Madoni (1994) para o estabelecimento de correlações entre espécies e grupos específicos com parâmetros operacionais e qualidade do efluente final. Contudo, estudos deste tipo impunham, desde logo, a necessidade de um zoólogo para identificar os protozoários e metazoários e proceder à sua classificação. Este facto potenciou o uso de metodologias de análise de imagem para obviar a este problema e a que estudos pioneiros fossem encetados por Amaral *et al.* (2003) e da Motta *et al.* (2001).

No que concerne aos processos anaeróbios, a manutenção da estrutura granular dos agregados microbianos dentro de um digestor anaeróbio é um dos aspectos mais importantes. Em condições adversas a biomassa granular pode-se deteriorar (desgranulação) afectando a estabilidade do reactor e provocando a lavagem (“*wash-out*”) da biomassa e consequentemente a uma diminuição da eficiência do reactor. O processo de granulação é, por definição, o processo pelo qual a biomassa se agrega para formar grânulos individuais complexos envolvendo diversos grupos tróficos de bactérias. Apesar de o fenómeno de granulação ter sido estudado de diferentes pontos de vista (Schmidt e Ahring, 1996), e de já se encontrar disponível uma grande base de dados tanto químicos como físicos, ainda não foi proposta uma teoria unificadora deste processo consensual. Por outro lado, sabe-se que os efluentes contendo lípidos são bastante problemáticos para a biomassa granular uma vez que estes adsorvem à sua superfície ao mesmo tempo que limitam a agregação de bactérias hidrofóbicas induzindo, deste modo, a flutuação da biomassa e correspondente “*wash-out*” (Hwu, 1997). Apesar de ser um dado adquirido que os processos de granulação e desgranulação estão normalmente associados a mudanças morfológicas macroscópicas, observações sistemáticas das mesmas não têm sido procedimento comum uma vez que se revelavam extremamente tediosas e difíceis de implementar. Tendo esse facto em mente, o uso de metodologias de análise de imagem a partir das observações macro e microscópicas é uma ferramenta muito útil uma vez que permite o estudo sistemático e quantitativo quer da biomassa granular quer das bactérias filamentosas dispersas. Assim, foram publicados alguns

estudos direccionados para o esclarecimento da morfologia de agregados anaeróbios e na distinção entre biomassa granular e flocular (Alves *et al.*, 2000). Outros trabalhos focaram a optimização do processo de granulação através da monitorização da evolução morfológica da biomassa e identificação de momentos-chave como o tempo de granulação (Araya-Kroff *et al.*, 2004) e de fenómenos de desgranulação (Amaral *et al.*, 2004).

MATERIAL E MÉTODOS

No decurso deste trabalho foram aplicadas metodologias de processamento e análise de imagem para a obtenção de dados morfológicos e posterior tratamento por técnicas de estatística multivariável como regressão de mínimos quadrados parciais multivariável (Einax *et al.*, 1997), análise discriminante (Einax *et al.*, 1997) e redes neuronais (Kasabov, 1996). A regressão de mínimos quadrados multivariável (PLS) extrai combinações lineares entre as variáveis dependentes e independentes e inter-relaciona cada um dos grupos de variáveis, enquanto que a análise discriminante determina novas variáveis (funções discriminantes) como combinações lineares das variáveis iniciais, ao passo que as redes neuronais permitem determinar quer funções lineares quer não-lineares conectando as variáveis dependentes às independentes. Globalmente, este estudo comportou dois eixos principais: monitorização de uma ETAR referente a um processo aeróbio e monitorização de um processo anaeróbio de granulação e desgranulação num digestor de tipo EGSB.

No estudo do processo aeróbio a monitorização da biomassa bacteriana da ETAR foi efectuada pela determinação do conteúdo e morfologia dos agregados microbianos e conteúdo em bactérias filamentosas através do desenvolvimento de um programa dedicado de processamento e análise de imagem no software comercial *Matlab* (*The Mathworks, Inc.*). Os parâmetros operatórios sólidos suspensos totais (TSS), tempo de retenção hidráulico e índice volumétrico de lamelas (IVL) foram também determinados segundo metodologias clássicas (APHA *et al.*, 1989). Procurou-se seguidamente estabelecer correlações entre os parâmetros morfológicos obtidos com os sólidos suspensos totais por um lado e com o índice volumétrico de lamelas por outro. Para esse efeito foi utilizada a regressão de mínimos quadrados parciais multivariável com recurso à *toolbox* de estatística do *Matlab* de modo a se determinar as relações entre os parâmetros morfológicos e os operacionais.

A identificação semi-automática e classificação dos protozoários e metazoários foi conseguida pela determinação dos parâmetros morfológicos dos mesmos com recurso ao desenvolvimento de um programa dedicado de processamento e análise de imagem no software comercial *Visilog* (*Noesis, SA*). De modo a se proceder à identificação de cada protozoário e metazoário, os seus dados morfológicos foram seguidamente tratados quer através da análise discriminante quer através das redes neuronais para organismos-teste seleccionados com recurso à *toolbox* de estatística do *Matlab*. Após a obtenção dos modelos de cada uma destas técnicas estes foram aplicados a novos organismos e a sua conformidade verificada. Finalmente foi determinada a capacidade de aferição dos parâmetros carga orgânica, arejamento, idade das lamelas, nitrificação e qualidade do efluente final através deste método de reconhecimento semi-automático dos protozoários e metazoários.

O estudo do processo anaeróbio de granulação através da identificação do mecanismo de granulação e de momentos-chave do processo, assim como a monitorização da deterioração dos grânulos num processo de desgranulação por adição de oleato envolveram a determinação do conteúdo e morfologia dos agregados microbianos e conteúdo em bactérias filamentosas. Para este efeito foi elaborado um programa dedicado de processamento e análise de imagem no software comercial *Matlab*. Os parâmetros operatórios carência química de oxigénio, sólidos suspensos voláteis, tempo de retenção hidráulico, carga orgânica e velocidade

ascensional foram também determinados segundo metodologias clássicas (APHA *et al.*, 1989).

No decurso deste trabalho foram determinados um total de 42 parâmetros morfológicos sendo 35 de natureza euclidiana e 7 dimensões fractais focando os seguintes aspectos: tamanho, robustez, alongamento e irregularidade da fronteira dos agregados (ou protozoários e metazoários), conteúdo em agregados, bactérias filamentosas dispersas e relação entre estes.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Na monitorização das lamas activadas da ETAR verificou-se que os valores do IVL foram sempre bastante elevados (variando de 200 a 620 mL/g) denotando a existência de um problema de “*bulking*” intenso. Analisando o tamanho dos agregados verificou-se um predomínio dos agregados da gama intermédia (0.1-1 mm de diâmetro) em termos da percentagem em área total seguidos pela gama de tamanho inferior (0.02-0.1 mm) ao passo que os agregados maiores (>1 mm) apresentaram sempre valores praticamente residuais. A análise da morfologia das duas classes de agregados maiores revelou que estes possuíam uma estrutura aberta (solidez média de 0.57), alongada (excentricidade média de 0.85) e com fronteiras irregulares (convexidade média de 0.27). Em concomitância com estes resultados verificou-se ainda que os valores da razão entre bactérias filamentosas dispersas e sólidos suspensos (TL/TSS) eram bastante elevados (variando entre 10000 e 60000 m/g) indiciando claramente ser o problema de “*bulking*” de origem filamentosa e não zooglear. Na sequência da realização da análise de regressão de mínimos quadrados parciais multivariável (PLS) envolvendo o índice volumétrico de lamas (IVL) e parâmetros morfológicos foi verificada uma correlação aceitável (0.885) com a razão TL/TSS (com 3 valores rejeitados). No que respeita à análise PLS para os sólidos suspensos (TSS) foi revelada uma forte correlação (0.934) com a área total (TA) dos agregados (com 2 valores rejeitados).

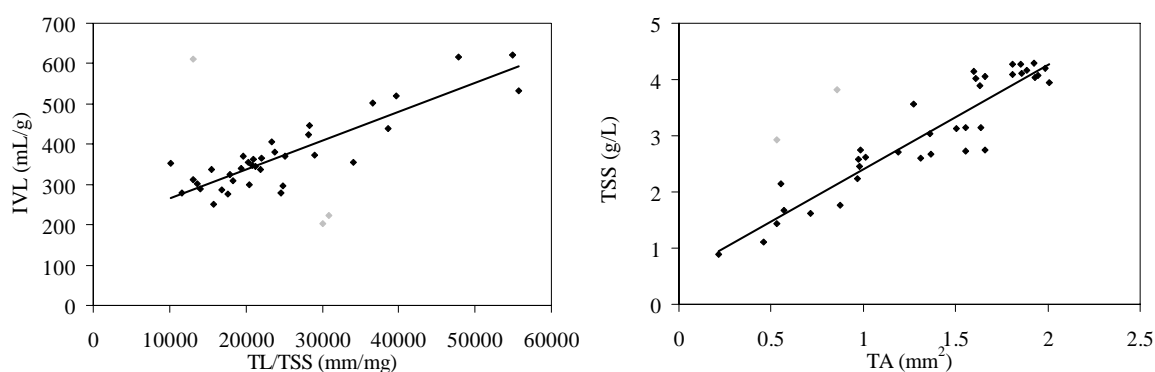


Figura 1 – Correlações obtidas entre IVL e razão TL/TSS e entre TSS e TA.

A aplicação de técnicas de análise de imagem e de estatística multivariável para a identificação e classificação de protozoários e metazoários forneceu resultados prometedores. Apesar de ambas as técnicas estatísticas utilizadas obterem resultados muito próximos a análise discriminante revelou-se mais adequada de um modo geral com excepção da aferição de condições críticas de funcionamento. Assim, no tocante à identificação global de cada microrganismo obteve-se uma percentagem de reconhecimento de 85.1%, de classificação errónea de 13.3% e cerca de 1.5% dos microrganismos não foram identificados. Na classificação nos principais grupos de protozoários e metazoários, bem como dos intra-grupos de protozoários ciliados as percentagens de reconhecimento foram sempre superiores a 97%, a classificação errónea situou-se abaixo dos 1.5% e cerca de 1.5% dos microrganismos não foram identificados. Finalmente, quanto à aferição das condições operatórias da estação

obtiveram-se sempre percentagens gerais de reconhecimento acima de 89% com uma classificação errónea abaixo dos 9.1%.

No processo anaeróbio de granulação da biomassa num reactor EGSB verificou-se um aumento no tamanho dos agregados ao longo da experiência como demonstrado pelo incremento em percentagem de área total das gamas de agregados mais elevadas (0.1-1 mm e >1 mm em diâmetro). Verificou-se também uma grande sensibilidade dos grânulos a aumentos bruscos da velocidade ascensional do líquido e da carga orgânica causando a sua deterioração ou disrupção bem como a uma libertação de bactérias filamentosas. A partir da monitorização morfológica dos agregados maiores foi possível determinar um tempo de granulação de cerca de 254 dias, uma vez que se revelou ser este o tempo necessário para a obtenção e estabilização de agregados robustos, compactos (robustez superior a 0.9) e de fronteiras suaves (convexidade superior a 0.75). Foi também possível observar o mecanismo de granulação que comportou as seguintes fases: a primeira decorreu até cerca do dia 50 tendo sido predominante o crescimento das bactérias filamentosas dispersas; numa segunda fase entre os dias 50 e 115 notou-se um crescimento mais acentuado dos agregados microbianos a partir da estrutura dorsal formada pelas bactérias filamentosas dispersas; finalmente a terceira fase a partir do dia 115 foi caracterizada por um crescimento equilibrado entre agregados e bactérias filamentosas dispersas.

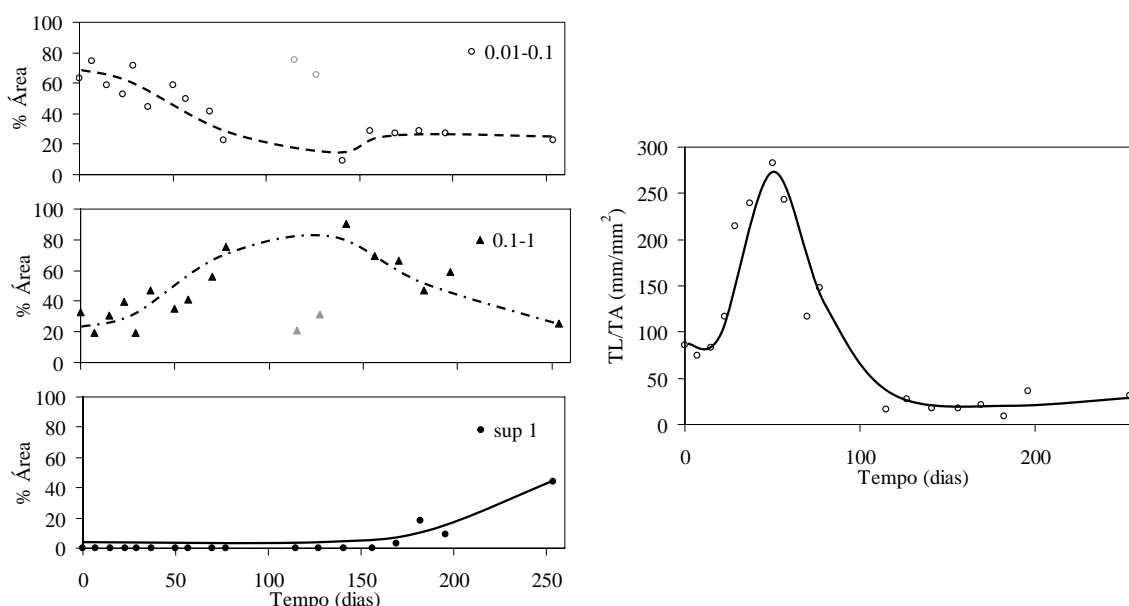


Figura 2 – Evolução da percentagem em área dos agregados e razão TL/TA ao longo do tempo.

Durante o decurso da experiência de desgranulação provocada pela alimentação com oleato foi evidente através da análise dos sólidos suspensos voláteis à saída do digestor um fenómeno de lavagem (“wash-out”) da biomassa. Foi também observada uma estratificação no reactor em termos da obtenção de agregados com tamanho e quantidade de substrato adsorvida superiores no topo do reactor, indiciando a existência de agregados maiores mas menos densos nessa zona. Analisando estes resultados conjuntamente com o facto de se ter evidenciado um incremento no tamanho e na percentagem em área total dos agregados intermédios (0.1-1 mm em diâmetro) concomitante com um decréscimo nos agregados maiores (>1 mm), é de todo admissível um fenómeno de adsorção de oleato aos agregados intermédios tornando-os maiores e menos densos. Deste modo estes agregados teriam tendência a subir no reactor, como comprovado pela estratificação dos agregados por tamanho

e substrato adsorvido e a conseqüentemente sofrerem um processo de lavagem o que explicaria a redução da percentagem dos agregados maiores no total. Ao analisarmos a razão entre o conteúdo em bactérias filamentosas dispersas e a biomassa agregada foi notória uma tendência crescente com o tempo assim como uma estratificação dentro do reactor com valores mais elevados no topo. Estes resultados demonstram, como seria de esperar, uma mudança do conteúdo em bactérias filamentosas de uma estrutura regular e compacta para uma maior dispersão, deslocamento para o topo do reactor e lavagem ao longo do tempo.

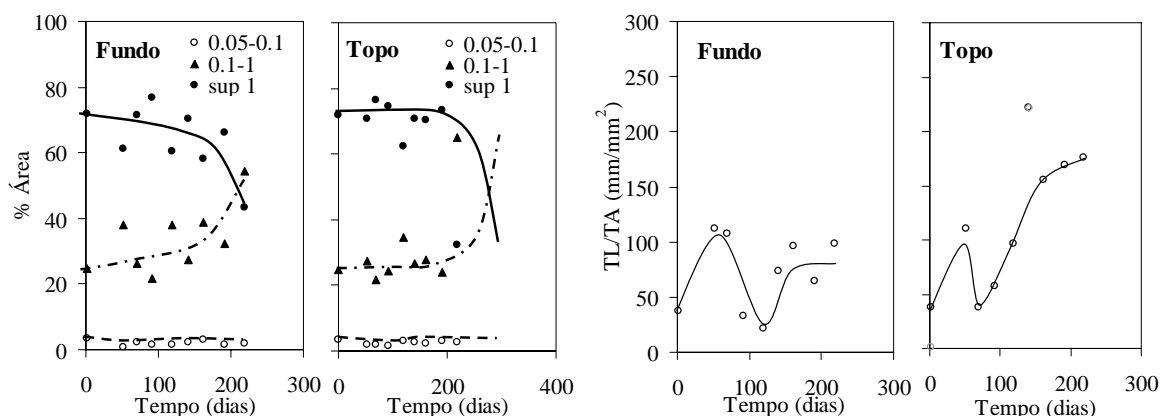


Figura 3 – Evolução da percentagem em área e razão TL/TA ao longo do tempo para o fundo e o topo do digestor anaeróbio.

CONCLUSÕES

No estudo referente ao processo aeróbio de tratamento de águas residuais, os valores elevados do IVL denotaram a existência de um problema de “bulking” intenso de natureza não-zoogleal (predomínio de flocos de tamanho normal) apoiado pelo facto dos valores da razão entre bactérias filamentosas dispersas e sólidos suspensos serem elevados. Constatou-se que este último parâmetro pode prever, em certa medida, o comportamento do IVL enquanto que os SST podem ser previstos pela área total de agregados devendo, contudo, ser referido que para ETARs funcionando em diferentes condições as correlações obtidas poderão não se manter válidas. A identificação dos protozoários e metazoários revelou-se satisfatória em termos de reconhecimento global e da classificação errónea, enquanto que para os principais grupos de protozoários e metazoários bem como de ciliados foi bastante elevada. O mesmo se passou na aferição das condições de operação tais como a qualidade do efluente, arejamento, idade das lamas e nitrificação. Deve, contudo, ser referido que na determinação das condições críticas de funcionamento como baixa qualidade do efluente, arejamento insuficiente e lamas jovens os resultados foram apenas razoáveis.

No estudo da granulação em processos anaeróbios verificou-se um incremento do tamanho dos agregados e do seu conteúdo dentro do reactor ao longo da experiência, bem como o estabelecimento do tempo de granulação através da monitorização da morfologia dos agregados. Foi também possível identificar uma fase inicial de crescimento preferencial das bactérias filamentosas, seguida por uma segunda fase de crescimento dos agregados utilizando as bactérias filamentosas como estrutura dorsal e uma fase final de crescimento equilibrado entre as bactérias filamentosas e os agregados. Relativamente ao processo de desgranulação, a aferição da morfologia dos agregados permitiu distinguir um decréscimo do tamanho ao longo da experiência bem como a sua estratificação com os maiores a situarem-se no topo do reactor. Foi ainda visível que este processo resultou numa estrutura mais dispersa

em termos das bactérias filamentosas e agregados mais leves que migraram para o topo do reactor onde os mais leves sofreram um fenómeno de lavagem.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves, M.M.; Ferreira, E.C.; Amaral, A.L.; Pereira, M.A.; Novais, J.M. e Mota, M. (2000), Staged and non-staged anaerobic filters: performance in relation to physical and biological characteristics of microbial aggregates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 75, p. 601-609.

Amaral, A.L.; Rodrigues, S.; Mota, M. e Ferreira, E.C. (2002), Morphological Characterisation of Biosolids in Wastewater Treatment using Partial Least Squares'. *Actas da 2nd IASTED International Conference on Visualization, Imaging and Image Processing*, Malaga, p. 300-305.

Amaral, A.L.; da Motta, M.; Pons, M.N.; Vivier, H.; Roche, N.; Mota, M. e Ferreira, E.C. (2003), Survey of Protozoa and Metazoa populations in wastewater treatment plants by image analysis and discriminant analysis. *Environmetrics*, v. 14, p. 1-10.

Amaral, A.L.; Pereira, M.A.; da Motta, M.; Pons, M.-N.; Mota, M.; Ferreira, E.C. e Alves, M.M. (2004), Development of Image Analysis Techniques as a Tool to Detect and Quantify Morphological Changes in Anaerobic Sludge: II. Application to a Granule Deterioration Process Triggered by Contact With Oleic Acid, *Biotechnology & Bioengineering*, v. 87, n. 2, p. 194-199.

APHA; AWWA e WPCF (1989), *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, American Public Health Association, Washington D.C.

Araya-Kroff, P.; Amaral, A.L.; Neves, L.; Ferreira, E.C.; Pons, M.-N.; Mota, M. e Alves, M.M. (2004), Development of Image Analysis Techniques as a Tool to Detect and Quantify Morphological Changes in Anaerobic Sludge: I. Application to a Granulation Process, *Biotechnology & Bioengineering*, v. 87, n. 2, p. 184-193.

da Motta, M.; Pons, M.N.; Vivier, H.; Amaral, A.L.; Ferreira, E.C.; Roche, N. e Mota, M. (2001), Study of Protozoa Population in Wastewater Treatment Plants by Image Analysis. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 18, p. 103-111.

da Motta, M.; Pons, M.N.; Roche, N.; Vivier, H.; Amaral, A.L.; Ferreira, E.C. e Mota, M. (2003), Estudo do funcionamento de estações de tratamento de esgotos por análise de imagem: validações e estudo de caso. *Engenharia Sanitária e Ambiental*, v. 8, n. 3, p. 170-181.

Einax, J.W.; Zwanziger, H.W. e Geiss, S. (1997), *Chemometrics in Environmental Analysis*, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Grijpspeerdt, K. e Verstraete, W. (1997), Image Analysis to Estimate the Settleability and Concentration of Activated Sludge. *Water Research*, v. 31, p. 1126-1134.

Hwu, C.S. (1997), Enhancing Anaerobic Treatment of Wastewaters Containing Oleic Acid. *Tese de Doutorado*, Wageningen Agricultural University, Wageningen.

Kasabov, N.K. (1996), *Foundations of Neural Networks, Fuzzy Systems and Knowledge Engineering*, The MIT Press, Cambridge MA.

Madoni, P. (1994), A Sludge Biotic Index (SBI) for the Evaluation of the Biological Performance of Activated-Sludge Plants Based on the Microfauna Analysis. *Water Research*, v. 28, n. 1, p. 67-75.

Richard, M. (1989), *Activated Sludge Microbiology*, The Water Pollution Control Federation, Alexandria.

Schmidt, J. e Ahring, B. (1996), Review: Granular Sludge Formation in Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) Reactors. *Biotechnology & Bioengineering*, v. 49, p. 229-246.

Sezgin, M. (1982), Variation of Sludge Volume Index with Activated Sludge Characteristics. *Water Research*, v. 16, p. 83-88.